



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/29, 5/10, A01H 5/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/08161 (43) 国際公開日 2000年2月17日(17.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01057 (22) 国際出願日 1999年3月4日(04.03.99) (30) 優先権データ 特願平10/223897 1998年8月7日(07.08.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 農林水産省農業生物資源研究所長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL RESOURCES)[JP/JP] 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki, (JP) 生物系特定産業技術研究推進機構 (BIO-ORIENTED TECHNOLOGY RESEARCH ADVANCEMENT INSTITUTION)[JP/JP] 〒331-8537 埼玉県大宮市日新町1丁目40-2 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 高岩文雄(TAKAIWA, Fumio)[JP/JP] 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水産省農業生物資源研究所内 Ibaraki, (JP)		内海 成(UTSUMI, Shigeru)[JP/JP] 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄 京都大学 食糧科学研究所内 Kyoto, (JP) 勝部朋之(KATSUBE, Tomoyuki)[JP/JP] 〒690-0044 島根県松江市浜乃木7丁目24-2 島根県立島根女子短大内 Shimane, (JP) (74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 CA, US 添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する 陳述。
(54)Title: TRANSGENIC PLANTS WITH THE EXPRESSION OF SOYBEAN GLYCININ (54)発明の名称 ダイズグリシニンを発現するトランスジェニック植物 (57) Abstract Transgenic rice plants obtained by isolating the promoter region of a glutelin gene capable of expressing the gene in the albumen of rice seed; constructing a vector wherein natural and modified soybean glycinin genes are ligated to the downstream of the promoter; and then transferring this vector into cultured rice cells. As the results of examinations on the tissue specificity and the morphology of the soybean glycinin expressed in the transgenic rice plants thus obtained, it is found out that the soybean glycinin expressed in rice is accumulated in rice seeds and the thus accumulated soybean glycinin exists as the processed maturation type.		

(57)要約

イネ種子の胚乳に特異的に遺伝子を発現させるグルテリン遺伝子のプロモーター領域を単離して、該プロモーターの下流に天然型および改造型のダイズグリシニン遺伝子が連結されたベクターを構築し、該ベクターをイネ培養細胞に導入して、トランスジェニックイネ植物体を得た。作出したトランスジェニックイネ植物体において発現させたダイズグリシニンの組織特異性および形態につき検討を行った結果、イネにおいて発現させたダイズグリシニンがイネ種子に蓄積しており、また蓄積したダイズグリシニンがプロセッシング過程を経た成熟型として存在することを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FJ	フィジー	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	HR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明細書

ダイズグリシニンを発現するトランスジェニック植物

技術分野

本発明は、食物成分として有用なダイズグリシニンを発現させた植物およびその繁殖媒体に関し、農業や食品などの分野に属する。

背景技術

ダイズからタンパク質を抽出し、酸沈殿 (pH4.5) させたダイズ分離タンパク質 (ダイズグロブリンを主要成分としている) は、ヒトの血清コレステロール値を低下させ、動脈硬化や冠状動脈性心疾患などの予防や治療に有効である。特に、高コレステロール血症患者の総コレステロール値、LDL-コレステロール値及びトリグリセリド値の低下に顕著な効果がある (Mercer, N.J.H., Carroll, K.K., Giovannetti, P.M., Steinke, F.H. and Wolfe, B.M., Nutr. Rep. Int., 35, 279-287 (1987)、井村 隆、田中真実、渡辺 毅、工藤重光、打田悌治、金沢武動 Ther. Res., 17, 2451-2456 (1996)、菅野道廣 食品工業, 39 (18), 59-68 (1996))。また、コレステロール値が正常範囲の健常者においても総コレステロール値に有意の低下が見られる (Kito, M., Moriyama, T., Kimura, Y. and Kambara, H. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 354-355 (1993)、神原啓文、野原隆司、鬼頭 誠 Ther. Res., 14, 3197-3204 (1993))。

ダイズのコレステロール値低下機能に対して、ダイズタンパク質によるコレステロールや胆汁酸の吸収阻害が第一義的な役割を果たしている (菅野道廣 食品工業, 39 (18), 59-68 (1996))。すなわち、コレステロールの吸収が阻害された結果、肝臓でのコレステロール合成が上昇する。しかし、同時に胆汁酸の再吸収も阻害されるので肝臓のコレステロールは胆汁酸へと酸化される。この結果、肝

臓のコレステロール濃度が低くなり、血清中のコレステロールの肝臓への取り込みが促進され、血清コレステロール値が低下することになる（菅野道廣 食品工業，39（18），59-68（1996））。

ダイズタンパク質をプロテアーゼで強く消化したときの不消化画分が強い血清コレステロール値低下作用を示すことが知られている（菅野道廣 食品工業，39（18），59-68（1996））。不消化画分に存在するペプチドの一次構造は決定されていない（菅野道廣 食品工業，39（18），59-68（1996））。一方、ダイズグロブリンの主要成分であるグリシニンのA1aB1bサブユニットに由来するペプチドが胆汁酸結合能を持つことが示されており（牧野志雄 食品工業，39（24），77-87（1996））、上記不消化画分は、A1aB1bサブユニットに由来する胆汁酸結合性ペプチドに由来していると考えられている（菅野道廣 食品工業，39（18），59-68（1996））。また、ダイズタンパク質に由来する疎水性ペプチドが胆汁酸結合能を有することが知られている（Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F. Agric. Bio l. Chem., 50, 1217-1222（1986））。ダイズグロブリンの中で、グリシニンが最も疎水性に富み、A1aB1bサブユニットに由来する胆汁酸結合性ペプチド中にも疎水性領域が2ヶ所存在する（内海 成 食品工業，40（10），68-79（1997））。したがって、ダイズタンパク質の血清コレステロール値低下機能は、主にグリシニンに存在しており、特にA1aB1bサブユニットへの依存度が高いと考えられる。

ダイズ分離タンパク質の産業上の応用としては、食品分野において、不二製油のダイズからあげ、プロテインがんも、かねさ株式会社のG-9、G-9 100、日本ハムのてりやきミートボール、ハンバーグ、ポールフランクなどが販売されている。しかしながら、グリシニン自体を添加した機能性食品に関しては、これまでに報告されていない。

一方、農業分野においても、ダイズグリシニンの特性を他の植物に付与するなどの試みは報告されていない。

発明の開示

本発明者らは、上記のようなダイズグリシニンの性質に着目し、ダイズグリシニンをダイズ以外の植物種において発現させることにより、コレステロール値低下機能などのダイズにみられる特性を他の植物種において実現することが可能であると考えた。また、本発明者らは、ダイズグリシニンタンパク質が、上記コレステロール値低下機能以外にも、水溶性で豆腐のように幅広い加工用途があること、およびコメなどには少ない必須アミノ酸「リジン」を多く含むため栄養性の観点からも優れていることにも着目し、他の農作物においてダイズグリシニンタンパク質を発現させることにより新しい加工食品の生産や、栄養価の高い新たな農作物の生産を行うことが可能であると考えた。従って、本発明は、ダイズグリシニンを発現させた植物、特に食糧として有用な農作物を提供することを課題とする。

イネは、その種子であるコメが我々の食生活において不可欠であり、最も重要な農作物の一つである。コメには、そのタンパク質の80%を占める、主要貯蔵タンパク質グルテリンが存在する。グルテリンは、ダイズグリシニンとアミノ酸配列レベルで32~37%の相同性があり、基本構造が類似している。即ちグリシニン・グルテリンどちらも、シグナルペプチド、A鎖、B鎖から成るプレプロ型として生合成され、プロ型を経て、配列がよく保存された特異的部位でプロセッシングを受けて成熟型になる。グリシニンは3量体を経て6量体に分子集合し、塩溶液可溶性であり、グルテリンはジスルフィド結合や疎水的結合により巨大分子化していると考えられ塩溶液不溶性であるという相違も存在するが、基本構造の類似性などから、両タンパク質は共通の祖先遺伝子に由来していると考えられている（図1）。そこで、このグルテリン遺伝子のプロモータを用いて、栄養性や加工特性が優れ、ヒトの血清中コレステロール値を低下させる健康維持増進性を備えたダイズグリシニンを、グルテリンと同様にコメ種子で発現、蓄積させることができれば、コメの野生型に近い形を維持したまま、コメの付加価値を高めうると考え

られる。また、グリシニンとグルテリンのハイブリッドタンパク質の蓄積も期待できる。そこで、本発明者らは、ダイズグリシニンを発現させる植物として、特にイネを選択し、その種子であり有用農作物であるコメにおいてダイズグリシニンの発現および蓄積を行った。

具体的には、イネ種子の胚乳に特異的に遺伝子を発現させるグルテリン遺伝子のプロモーター領域を単離して、該プロモーターの下流に天然型あるいは改造型のダイズグリシニン遺伝子が連結されたベクターを構築し、これらキメラ遺伝子をイネ培養細胞に導入して、トランスジェニックイネ植物体を得た。次いで、作出したトランスジェニックイネ植物体において発現させたダイズグリシニンの組織特異性および形態につき検討を行った。その結果、本発明者らは、イネにおいて発現させたダイズグリシニンがイネ種子に蓄積しており、また蓄積したダイズグリシニンがプロセッシング過程を経た成熟型として存在することを見出した。即ち、本発明者らは、イネ種子においてダイズグリシニンを発現させ、機能的な形態で蓄積させることに成功し、本発明を完成した。

本発明は、ダイズグリシニン遺伝子が導入された植物細胞および植物体、好ましくはイネ植物体、並びにその繁殖媒体に関し、より具体的には、

- (1) ダイズグリシニンタンパク質をコードする遺伝子を発現可能に保持するトランスジェニック植物細胞、
- (2) ダイズグリシニンタンパク質がAlaB1bサブユニットである、(1)に記載のトランスジェニック植物細胞、
- (3) ダイズグリシニンタンパク質をコードする遺伝子がイネグルテリン遺伝子のプロモーターの下流に結合している、(1)または(2)に記載のトランスジェニック植物細胞、
- (4) (1)から(3)のいずれかに記載のトランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック植物体、
- (5) イネ科植物である、(4)に記載のトランスジェニック植物体、

- (6) イネである、(4)に記載のトランスジェニック植物体、
- (7) 少なくともその一部にダイズグリシニンタンパク質が蓄積している、(4)から(6)のいずれかに記載のトランスジェニック植物体、
- (8) (4)から(6)のいずれかに記載の植物体の繁殖媒体、
- (9) コメである、(8)に記載の繁殖媒体、
- (10) ダイズグリシニンタンパク質が蓄積している、(8)または(9)に記載の繁殖媒体、に関する。

本発明は、ダイズグリシニンタンパク質をコードする遺伝子が導入された植物細胞および植物体、並びにその繁殖媒体に関する。

ダイズグリシニンは、A1aB1b, A1bB2, A2B1a, A3B4, A5A4B3のサブユニットが、ほぼランダムに6個組み合わせられて形成されている(グリシニンのサブユニット構造および配列については、文献「Utsumi, S. et al., Marcel Dekker, 257-291, 1997、Utsumi, S. et al., J. Agric. Food. Chem., 35, 210-214, 1987、Cho, T.-J. and Nielsen, N.C., Nucl. Acids Res., 17, 4338, 1989、Utsumi, S. et al., Agric. Biol. Chem., 51, 3267-3273, 1987、Fukazawa, C. et al., J. Biol. Chem., 260, 6234-6239, 1985、Momma, T. et al., Eur. J. Biochem., 149, 491-496, 1985」参照のこと)。本発明において植物細胞内で発現させるダイズグリシニンタンパク質をコードする遺伝子としては、これらダイズグリシニンのサブユニットをコードする限り特に制限はないが、コレステロール値低下機能などが知られているA1aB1bサブユニット(配列番号: 1)またはこれと同様の効果を示すと考えられるA1bB2若しくはA2B1aサブユニットをコードする遺伝子が特に好ましい。本発明においては、植物細胞内においてこれらサブユニットのうち単一のサブユニットを発現させてもよく、また複数のサブユニットを組み合わせ発現させてもよい。

また、天然型のダイズグリシニンタンパク質のみならず、その機能的誘導体を発現させてもよい。「機能的誘導体」とは、天然型のタンパク質のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、および／若しくは付加したア

ミノ酸配列からなり、天然型のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を指す。機能的に同等とは、変異タンパク質が天然型のタンパク質と同等のコレステロール値低下作用、加工特性、および／または栄養性を有していることを指す。機能的誘導体は、自然界において生じることもあるが、人為的に調製することも可能である。人為的な調製方法としては、例えば、一本鎖のオリゴヌクレオチドを利用して部位特異的に特定のアミノ酸（1～複数残基）を他のアミノ酸に置換する、欠失させる、あるいは特定の部位にアミノ酸（1～複数残基）を挿入する方法、特定の制限酵素サイトを利用して二本鎖の外来遺伝子あるいは合成遺伝子のアミノ酸を挿入、置換、あるいは欠失させる方法などが挙げられる（Utsumi, S., Adv. Food Nutr. Res., 36, 89-208, 1992参照）。

ダイズグリシニン遺伝子を導入する植物細胞としては、特に制限はなく、あらゆる植物種に由来する細胞を用いることが可能であるが、ダイズグリシニンのコレステロール値低下機能などを生体内において発揮させるという本発明の目的からして、特に農作物の細胞が好ましい。農作物としては、例えば、イネ、オオムギ、コムギ、ライムギ、トウモロコシなどの穀類、インゲンマメ、ソラマメ、エンドウなどの豆科作物、ピーナツ、ゴマ、ナタネ、綿実、ヒマワリ、サフラワーなどの油糧用種子作物、ジャガイモ、サツマイモなどの塊根を形成する作物、リンゴ、メロン、ブドウなどの果実を有する作物、ホウレン草、チンゲンサイ、キャベツなどのように葉が食用となる作物が挙げられる。本発明においてダイズグリシニン遺伝子が導入される植物細胞の形態としては、植物体に再生可能なあらゆる種類の形態の植物細胞が含まれる。例えば、培養細胞、プロトプラスト、苗条原基、多芽体、毛状根、カルスが挙げられるが、これらに制限されない。本発明における植物細胞には、植物体中の細胞も含まれる。

ダイズグリシニン遺伝子を植物細胞内で発現させるためには、(i)植物細胞内で転写可能なプロモーター配列、(ii)プロモーター配列の下流にセンス方向に結合されたダイズグリシニン遺伝子と、(iii)該遺伝子の下流に結合された、転写の終

結およびポリアデニル化に必要な配列を含むターミネーター配列、を含むDNA分子を植物細胞に導入する。このようなDNA分子は、プロモーター以外にも、転写をさらに増強するためのDNA配列、例えば、エンハンサー配列を含んでいてもよい。

用いられるプロモーターとしては、植物細胞内で機能するものであれば特に制限はないが、再生した植物体においてグリシニン遺伝子を発現させたい所望の部位で効果的な発現を保証する組織特異的プロモーターが好ましい。組織特異的プロモーターとしては、例えば、イネの種子において発現させる場合にはグルテリン遺伝子のプロモーター(Takaiwa, F. et al., *Plant Mol. Biol.*, 17, 875-885, 1991)、インゲンマメ、ソラマメ、エンドウなどの豆科作物やピーナツ、ゴマ、ナタネ、綿実、ヒマワリ、サフラワーなどの油糧用種子作物の種子において発現させる場合には、グリシニン遺伝子のプロモーターあるいは各作物の主要な貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーター、例えば、インゲンマメであればファゼオリン遺伝子のプロモーター (Murai, N. et al., *Science*, 222, 476-482, 1983)、ナタネであればクルシフェリン遺伝子のプロモーター (Rodin, J. et al., *Plant Mol. Biol.*, 20, 559-563, 1992) が挙げられる。また、ジャガイモの塊茎で発現させる場合には、パタチン遺伝子のプロモーター (Rocha-Sosa, M. et al., *EMBO J.*, 8, 23-29, 1989)、サツマイモの塊根で発現させる場合には、スボラミン遺伝子のプロモーター (Hattori, T. and Nakamura, K., *Plant Mol. Biol.*, 11, 417-426, 1988)、ホウレン草などの野菜の葉で発現させる場合には、リブローズ-1,5-ビスリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子のプロモーター (Orozco, B. M. and Ogren, W. L., *Plant Mol. Biol.*, 23, 1129-1138, 1993) が好適である。これらプロモーターの具体例は、あくまで例示であり、実際には目的に応じてこれら以外の様々なプロモーターを利用することが可能である。また、上記組織特異的プロモーター以外にも、例えば、35Sプロモーターなどの恒常的な発現のためのプロモーターや誘導可能なプロモーターを用いることも可能である。

植物細胞へのダイズグリシニン遺伝子の導入は、当技術分野における技術者に

公知の種々の方法を用いて導入することが可能である。例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンスやアグロバクテリウム・リゾゲネスを利用した間接導入法 (Hiei, Y. et al., Plant J., 6, 271-282, 1994、Takaiwa, F. et al., Plant Sci. 111, 39-49, 1995) や、エレクトロポレーション法 (Tada, Y. et al. Theor. Appl. Genet., 80, 475, 1990)、ポリエチレングリコール法 (Datta, S. K. et al., Plant Mol Biol., 20, 619-629, 1992)、パーティクルガン法 (Christou, P. et al., Plant J. 2, 275-281, 1992、Fromm, M. E., Bio/Technology, 8, 833-839, 1990) などに代表される直接導入法を用いることが可能である。

形質転換された植物細胞は、再生させることにより植物体を作出することができる。再生の方法は植物細胞の種類により異なるが、代表的な方法としては、例えば、イネであればFujimuraらの方法 (Fujimura, T. et al., Plant Tissue Culture Lett., 2, 74, 1995)、トウモロコシであればArmstrongらの方法 (Armstrong, C. L. and Phillips, R. L., Crop Sci., 28, 363-369, 1988)、ナタネであればRadkeらの方法 (Radke S. E., Theor. Appl. Genet. 75, 685-694, 1988)、ジャガイモであればSheermanらの方法 (Sheerman, S. and Bevan, M. W., Plant Cell Rep., 7, 13-16, 1988) が挙げられる。

これにより作出されたトランスジェニック植物体またはその繁殖媒体(例えば、種子、塊根、塊茎、果実、切穂など) から得た植物体には、導入したダイズグリシニン遺伝子の発現により、標的部位にダイズグリシニンが発現し、蓄積する。これにより栄養性、加工特性、健康増進特性などのダイズグリシニンタンパク質が保持する特性を他の植物種において実現することが可能である

図面の簡単な説明

図1は、ダイズグリシニンおよびイネグルテリンの成熟過程を示す図である。

図2は、本発明においてイネの形質転換に用いたプラスミド「pGluB1GlyN」および「pGluB1GlyIV」を示す図である。

図3は、トランスジェニックイネ植物体の完熟種子および葉におけるグリシニン遺伝子およびグルテリン遺伝子の発現をノーザンブロット法により検出した結果を示す電気泳動像写真である。図中の「DAF」は、開花後の日数を示す。

図4は、トランスジェニックイネ植物体の完熟種子における天然型および改造型グリシニンの発現をドットブロット解析した結果を示す図である。

図5は、トランスジェニックイネ植物体の完熟種子において発現する天然型および改造型グリシニンの分子集合形態を解析した結果を示す電気泳動写真である。

図6は、ダイズグリシニンとコメグルテリンの相互作用につき検出した結果を示す電気泳動写真である。

図7は、コメ種子における発現グリシニンのIn situ発現部位をティッシュプリント法により解析した結果を示す写真である。

図8は、連続抽出処理によるダイズグリシニンの溶解性解析の結果を示す電気泳動写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】 ダイズグリシニン発現ベクターの構築およびダイズグリシニンを発現する形質転換イネ植物体の作出

(1)ダイズグリシニンcDNAの単離

イネの形質転換に用いるダイズグリシニン発現プラスミドの構築を行った。具体的には、AlaB1b cDNAを含むpUG1 (S. Utsumi, S. Kitagawa, T. Katsube, I. J. Kang, A.B. Gidamis, F. Takaiwa, and M. Kito, 1993, 92(2):191-202) のXhoI断片 (1.7kb) をdNTP存在下でクレノウ修復した。

(2)イネグルテリン遺伝子プロモーターを有するベクターへのダイズグリシニンcDNAの挿入

グルテリンGluB-1遺伝子のゲノミッククローン入INE9 (Takaiwa, F. et al., *Plant. Mol. Biol.* 17, 875-885, 1991) のDNAをまず制限酵素KpnIとEcoRIで切断して、グルテリン遺伝子のプロモーターとN末端のコード領域を含む断片をクローニングし、サブクローンKpn9を得た。さらにこのサブクローンDNAを制限酵素Sau3Aで切断し、1.6kbのSau3A断片 (イネグルテリン遺伝子の転写領域330bpと5' 上流領域1.3kb) を得た。このプラスミドを用いてグルテリン遺伝子の転写開始点+18にある制限酵素AflIIIとpUC118ベクターにあるSmaIを利用してグルテリンのコード領域を除去し、この部分に(1)で調製したグリシニンcDNAを挿入した。方向性はグリシニンcDNA中にあるEcoRIサイトとpUC118ベクターのHindIIIサイトを利用して確認した。

GluB-1プロモータ(-1302から+18)とグリシニンcDNAを含む断片をHindIIIおよびSacI消化により回収し、GluB-1の3' 非翻訳領域0.7 kb、CaMV35Sプロモータ、ピアラフォス耐性遺伝子(BAR)およびノパリン合成遺伝子ターミネータ(NOS terminator)を含むpUC18に挿入した。これにより構築したプラスミドを「pGluB1Gly」と命名した。同様にして、改質グリシニンcDNA (pUG1IV) (S. Utsumi, S. Kitagawa, T. Katsube, I.J. Kang, A.B. Gidamis, F. Takaiwa, and M. Kito, 1993, *Plant Sci.*, 92(2):191-202) とGluB-1プロモータ(-1302から+18)を含むキメラ遺伝子のプラスミドも調製した。このプラスミドを「pGluB1GlyIV」と命名した。構築したプラスミドの模式図を図2に示す。

形質転換体の作製は以下のように行った。イネのカルスを完熟種子の胚盤より誘導し、改変N6培地でカルスを培養し、プロトプラストをFujimuraらの方法 (Fujimura, T., et al., *Plant Tissue Culture Lett.* 2, 74-75, 1985) で単離した後、大槻らの方法 (大槻義昭ら, イネ・プロトプラストの効率的調製にかかわるけん濁培養条件, 育種学雑誌, 35巻, 別冊1, 78-79) でプロトプラスト培養を行った。

キメラ遺伝子を含むプラスミドを、エレクトロポレーション法によってプロトプラストに直接導入した。エレクトロポレーションは、Tadaら (Tada, Y. et al.,

Theor. Appl. Genet, 80, 475-480, 1990) のASP緩衝液を用いて、プラスミド20 μ g/ml、750V/cm、40msecで行った。組み換え体の選抜は、プロトプラスト培地、カルス増殖培地、および再分化培地に選抜マーカーのピアラフォス剤を10mg/l添加して行った。

「pGluB1Gly」と「pGluB1GlyIV」が導入された、それぞれ68個体と52個体（松山三井）、26個体と15個体（ひめのまい）を完熟まで育成した。植物体の再生は、Ozawaらの方法（Ozawa, K. and Komamine, A., Theor. Appl. Genet, 77, 205-211, 1989）に従った。グリシニン遺伝子およびBAR遺伝子がイネゲノムに挿入されていることは、グルテリンプロモーターとダイズグリシニン遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRにより確認した。

【実施例2】 グルテリンおよびグリシニンの組み換えタンパク質の調製

グルテリン（GluA-1、GluB-1）とグリシニン（A1aB1b）の成熟型タンパク質に相当するcDNA部分を、以下の組み合わせのプライマー、即ち、GluA-1（配列番号：2／5'-CAGCAGCTATTAGGCCAGAGCACTAG-3'、配列番号：3／5'-GGGAAGCTTTATCCGCAAGCCGACCTAAG-3'）、GluB-1（配列番号：4／5'-CAGCTATTTAATCCCAGCACAAACCC-3'、配列番号：5／5'-GGGAAGCTTACATTACTCTGAGGTCTCGC-3'）、A1aB1b（配列番号：6／5'-TTCAGTTCCAGAGAGCAGCC-3'、配列番号：7／5'-CGCGGATCCATACAAAAAGGGCTCTAAG-3'）を用いてPCR増幅した。それぞれのプライマー組み合わせのうち、後者のプライマーは成熟型サブユニットのC末端部分の塩基配列の相補鎖に相当し、GluA-1とGluB-1のプライマーについてはHindIIIサイトを、A1aB1bのプライマーについてはBamHIサイトを有している。PCR増幅断片は、ブランディングキット（Takara社）を使って末端平滑化した後、HindIII（GluA-1、GluB-1）もしくはBamHI（A1aB1b）で消化した。得られたDNA断片は、pET-21dベクター（Novagen社）のNcoI（末端修復済み）およびHindIIIサイト（GluA-1、GluB-1）、もしくはNcoI（末端修復済み）およびBamHIサイト（A1aB1b）に挿入し、大腸菌発現用プラスミドpEGluA-1、pEGluB-1、pEA1aB1bを構築した。それぞれの発現プラスミドを有する大腸菌BL21

(DE3)を、吸光度 A_{600} が0.6になるまでLB培地にて培養し、その後37°CでIPTG(終濃度1 mM)の添加により発現を誘導した。

〔実施例3〕 抗グルテリンGluA-1抗血清および抗グルテリンGluB-1抗血清の調製

プログルテリンGluA-1あるいはGluB-1を発現した大腸菌を、35 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)/0.1 M NaCl/1 mM EDTA/1.5 mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド(PMSF)で超音波処理した後に、大腸菌の塩可溶性タンパク質を除去した。その後、プログルテリンGluA-1あるいはGluB-1を、1 % (v/v)乳酸/1 mM EDTAで抽出した。抽出したプログルテリンを、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) /1 mM EDTA/1 mM PMSF/6 M 尿素/0.1 M 2-メルカプトエタノール(2ME) (緩衝液A) に対して透析し、緩衝液Aで平衡化したSP Sepharose FF (2.6 x 10 cm) (Pharmacia社)カラムクロマトグラフィーに供した。プログルテリンを0-0.2 M NaClの直線勾配により溶出し、得た部分精製サンプルを、さらにSDS-PAGEによって精製した。GluA-1およびGluB-1を、ゲル上の単一バンドから電氣的に溶出し、10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.6)/6 M 尿素に対し、十分に透析した。精製したプログルテリンGluA-1 およびGluB-1の各々を、Freund'sコンプリートアジュバントとともに乳化し、文献(S. Utsumi, S. Kitagawa, T. Katsube, I.J. Kang, A.B. Gidamis, F. Takaiwa, and M. Kito, 1993, Plant Sci., 92(2):191-202) の記載に従い、体重およそ2kgの雄ウサギに皮内注射した。一次免疫後、2週間目に二次免疫、その後3週間目に三次免疫、その後2週間目に四次免疫を行い、その10日後に採血して、抗血清を得た。

〔実施例4〕 RNAプロット解析

RNAを文献(Takaiwa, F. et al., Mol. Gen. Genet., 208, 15-22, 1987) の記載に従い、実施例1において作出したトランスジェニック植物体の葉、登熟中の種子より抽出した。15 ug の全RNAを、ホルムアルデヒドを含む 1.2 %変性アガロースゲルの電気泳動にかけたのち、帯電性ナイロンメンブレン(Amersham社)に転写した。メ

ンブレン上のRNAを、ランダムプライミング法(Feinberg, A.P. and Vogelstein, B., *Anl. Biochem.*, 13, 6-13, 1983) によって³²P標識したpUG1のグリシニンcDNAプローブを用いてハイブリダイゼーション処理した。比較のためにグルテリン (GluB-1) 遺伝子の発現も検出した (図3)。その結果、登熟過程において、グルテリン遺伝子と同程度のグリシニン遺伝子の発現が認められたが、葉においてはグリシニン遺伝子の発現が認められなかった。なお、図中の0, 5, 12, 16, 22は、開花後の日数を示す。

[実施例5] タンパク質の抽出と免疫学的検出

分離解析に関しては、天然型および改造型グリシニンを発現する最初の形質転換植物体の完熟種子50粒の各々を個別に乳鉢で粉碎し、35 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.6)/0.4 M NaCl/1.5 mM PMSF/1 mM EDTA (抽出用緩衝液)で4°Cにてタンパク質を抽出した。50粒各々の抽出液の一部 (タンパク質10 μ g) をニトロセルロース膜にスポッティングし、抗グリシニン抗血清、ヤギ抗ウサギIgG抗血清-アルカリフォスファターゼ複合体 (Promega社) (S. Utsumi, T. Sato, C.-S. Kim and M. Kito, 233 (1988) 273-276.) を使って発現産物を検出した。

その結果を図4に示す。天然型 (図左) では、最大5%程度、IV+4Met (図右) は最大0.5%程度の発現レベルを示した。この発現レベルの度数分布を図下にまとめた。発現レベルは高いもの、中ぐらいのもの、低いもの、そしてほとんど発現していないものが、それぞれおよそ4分の1ずつの割合で分布した。このことから、グリシニン遺伝子は単一コピー、もしくは数コピーが良く連鎖したゲノム領域に挿入されたことが示唆された。

なお、この実験結果においてノーマルとIV+4Metで最高発現レベルの差が10倍程度存在したが、これまでタバコやジャガイモで発現させた実験ではこのような相違は見られなかった。また、ノーザン分析においても転写レベルに同様の差異が見られた。このため、発現レベルの差異は、ポジション効果によるものと考えられる。

このように、発現量の高い種子（天然型：8、6、15、IV+4Met：8、19、3）は、グリシニン遺伝子がホモになっていると考えらる。そこで、半粒分析法により発現量の高い種子に由来する第2世代を育成した。その結果、第2世代の自家受精種子10粒ずつ調べたうち全ての種子において発現量が高いことが判明した。即ち、本発明者らは、グリシニン遺伝子をゲノムに固定することに成功した。

〔実施例6〕 ショ糖密度勾配遠心分離法による自己会合性の解析

分子集合や成熟型へのプロセッシングが正しく起こっているか調べるために、発現レベルの高い系統の種子塩抽出液をショ糖密度勾配遠心分離にかけた。100 mgの完熟種子より抽出緩衝液を使って抽出したタンパク質を、文献（S. Utsumi, S. Kitagawa, T. Katsube, I.J. Kang, A.B. Gidamis, F. Takaiwa, and M. Kito, 1993, Plant Sci., 92(2):191-202）の記載に従い、ショ糖密度勾配遠心分離法に供した。ThanhとShibasaki（V.H. Thanh and K. Shibasaki, J. Agric. Food Chem., 24（1976）1117-1121.）の方法に従ってダイズ種子より精製した2S、7S、11S画分を、サイズマーカーとして、同時に解析に供した。得られた画分は、SDS-PAGE後、ウエスタンブロッティングによって分析した。ウエスタンブロッティングに関しては、サンプル(25 ug)を、SDSサンプルバッファー（1 % (v/v) 2-メルカプトエタノール(2-ME)）を含有、または含有しない、62.5 mM トリス塩酸緩衝液(pH6.8)/2 % (w/v) SDS/30 % (v/v) グリセロール)に溶かして3分間煮沸処理し、SDS-PAGE（ポリアクリルアミド濃度11 %, w/v)に供した。ゲル中のタンパク質を、ニトロセルロース膜に転写し、抗プログリシニン抗血清、抗グリシニン抗血清、抗プログルテリン抗血清を用いて、実施例5と同様に検出した。

その結果を図5に示す。何も形質転換していないコントロールでは観察されないバンドが、IV+4Metではグリシニンの単量体、3量体、および6量体に相当する2S、7S、11Sのフラクションを中心に観察された。還元剤の非存在下では、成熟型グリシニンに相当するバンドとプログリシニンに相当する少しサイズの大きいバンドが観察された。還元剤の存在下では、プログリシニンに相当するバンドは2S

と7Sのフラクションにのみ見られ、グリシニンA鎖に相当するバンドは2S、7S、11Sのいずれのフラクションにも存在した。また、天然型ノーマルもIV+4Metと同様の結果を与えた。これらの結果は、天然型も改造型も同様に、成熟型へのプロセッシングを受け6量体に分子集合できることを示唆する。

次にコメで発現するダイズグリシニンとコメグルテリンとの相互作用について検討した。図6は、図5と同様コメ種子の塩抽出液、即ちグロブリン画分をショ糖密度勾配遠心で分離し、SDS-PAGE後、ウエスタンブロッティングを行い、グルテリン抗体で検出したものである。形質転換していないコントロールでは、2Sのフラクションを中心にグルテリンA鎖に相当するバンドが観察された。一方、グリシニンを発現する形質転換体の方では、コントロールで見られたバンドの他に、主に11Sのフラクションと一部7Sのフラクションにバンドが検出された。還元剤の非存在下では、プログルテリンに相当するサイズを示し、還元剤の存在下では、グルテリンA鎖に相当するサイズを示すことが判明した。この図において、レーンMとレーンPにはダイズの成熟型グリシニンとプログリシニンがそれぞれ1 μ gずつアプライされている。図から明らかなように、グルテリン抗体はそれらダイズグリシニンとほとんど交差していないため、11S、7Sのフラクションに観察されたバンドは、コメグルテリンであると考えられる。即ち、コメ種子においてダイズグリシニンを発現させたことにより、一部のグルテリンが塩溶液可溶性、即ちグロブリンになった。それらは、主にグリシニンと同じ11S・7Sのフラクションに存在することから、グリシニンと相互作用してハイブリッド6量体およびハイブリッド3量体を形成しているものと推察される。それら可溶化したグルテリンの量は、予備的な見積もりで、可溶性グリシニンの5%程度と推定された。

【実施例7】 ティッシュプリント法によるコメ種子における発現グリシニンのIn situ発現部位解析

グルテリンプロモータは種子の胚乳で特異的に発現する。そこで、この発現の組織特異性が保持されているかどうかを、ティッシュプリント法によって調べた。I

n situ発現部位解析を、Manteuffelら (R. Mo Manteuffel and R. Ranitz, Plant Mol. Biol., 22 (1993) 1129-1134.) の記載に従い、ティッシュプリント法によって行った。0.01 M リン酸緩衝液(pH7.4)/0.8 % (w/v) NaCl/0.2 % (w/v) KCl/10 mM Na₃PO₄/0.4 M スクロースに浸漬したコメ種子を、カミソリの刃を使って垂直に切断した。そして、脂質を除くために20秒間アセトンに浸した後、ニトロセルロース膜に5~10秒間押しつけた。その後、そのニトロセルロース膜を、60°Cで30分間乾燥させ、抗グリシニン抗血清を使ったイムノブロッティングに供した。その結果を図7に示す。左がコントロール、右がIV+4Metを示す。グリシニンは胚乳で発現し、胚では発現していなかった。また天然型ノーマルも改造型IV+4Metと同様の結果を与えた。つまり、天然型も改造型も発現の組織特異性が保持されていることが判明した。さらに、電子顕微鏡を用いた胚乳部の免疫組織化学的観察により、グリシニンはプロテインボディーのマトリックス部に認められた。即ち、発現グリシニンはプロテインボディーにソーティングされていることが判明した。

[実施例8] 連続抽出処理による溶解性解析

コメ種子(18 mg)を細かく粉碎し、各々1800 ulの25 mM N-エチルマレイミド(NEM)を含む抽出用緩衝液で6回、室温で1時間ずつ激しく振とうしながら連続的に抽出した。抽出用緩衝液で抽出した後の残さに対し、さらに3回、各々1800 ulの1 % (v/v)乳酸/1 mM EDTA/25 mM NEMで抽出処理を施した。最後に、その後の残さに対して1回、1800ulのSDSサンプルバッファーで同様に抽出処理を行った。

一方、逆に発現グリシニンがグルテリン化しているか否かにつき解析した。図8は、コメ種子に対し塩溶液で6回、十分な抽出操作を繰り返した後、1%乳酸で3回、さらにSDSで1回抽出操作して得られた各画分をSDS-PAGE後、ウェスタンブロッティングにかけグリシニン抗体で検出した。グルテリンは乳酸で抽出されるが、その抽出液に塩化ナトリウムを加えると沈澱する。図から明らかなように、塩溶液で抽出されるグリシニンは抽出操作を繰り返す度に少なくなり、6回目ではほと

んど消失した。しかしながら1%乳酸やSDSでは再びグリシニンが抽出されていた。このことから、一部の発現グリシニンはコメグルテリンと相互作用することで、グルテリン化しているものと推察される。それら不溶化した発現グリシニンの量は、予備的な見積もりで、全発現グリシニンのうちの20%程度と推定された。

産業上の利用の可能性

本発明により、ダイズグリシニンを発現するトランスジェニック植物およびその繁殖媒体が提供された。ダイズグリシニンは、栄養性や加工特性が優れていることに加え、ヒトの血清中コレステロール値を低下させる健康維持増進性を備えているため、本発明によれば付加価値を高めた農作物を生産することが可能である。また、ダイズグリシニンは、日常食べているダイズ由来のタンパク質であるため、本発明により生産された農作物は、安全性が高い点でも有益である。

請求の範囲

1. ダイズグリシニンタンパク質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック植物細胞。
2. ダイズグリシニンタンパク質がAlaB1bサブユニットである、請求項 1 に記載のトランスジェニック植物細胞。
3. ダイズグリシニンタンパク質をコードする遺伝子がイネグルテリン遺伝子のプロモーターの下流に結合している、請求項 1 または 2 に記載のトランスジェニック植物細胞。
4. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のトランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック植物体。
5. イネ科植物である、請求項 4 に記載のトランスジェニック植物体。
6. イネである、請求項 4 に記載のトランスジェニック植物体。
7. 少なくともその一部にダイズグリシニンタンパク質が蓄積している、請求項 4 から 6 のいずれかに記載のトランスジェニック植物体。
8. 請求項 4 から 6 のいずれかに記載の植物体の繁殖媒体。
9. コメである、請求項 8 に記載の繁殖媒体。
10. ダイズグリシニンタンパク質が蓄積している、請求項 8 または 9 に記載の繁殖媒体。

1/8

図 1

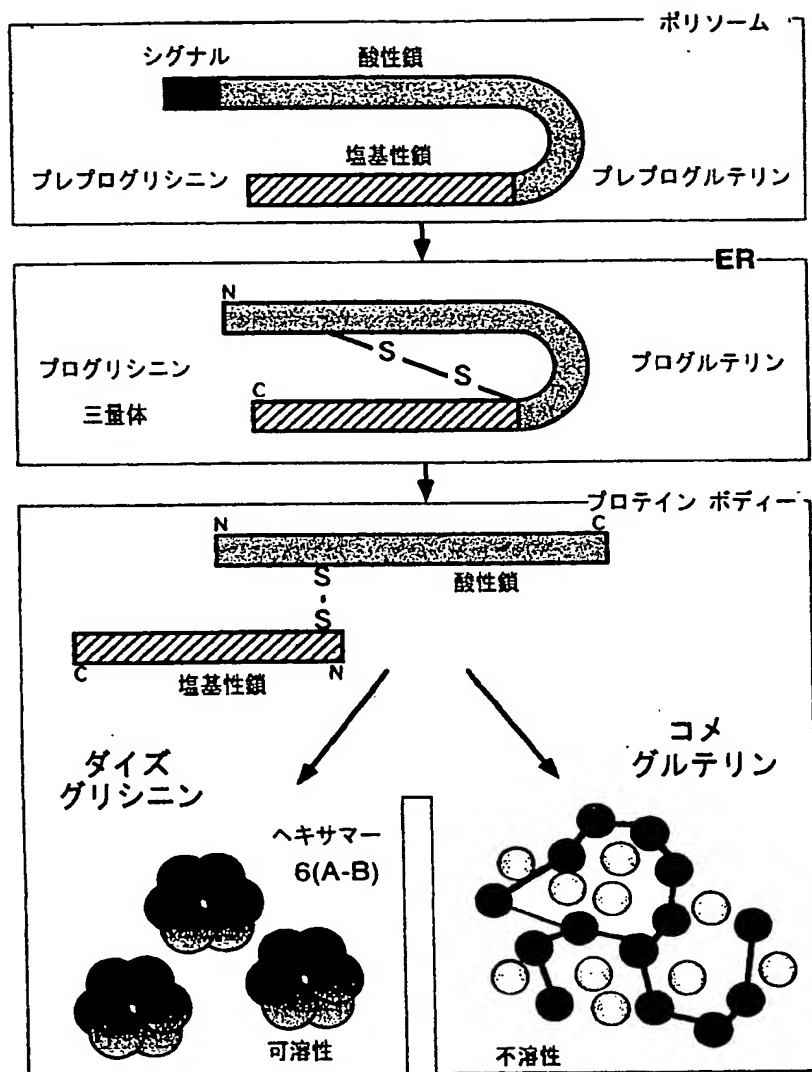


图 2

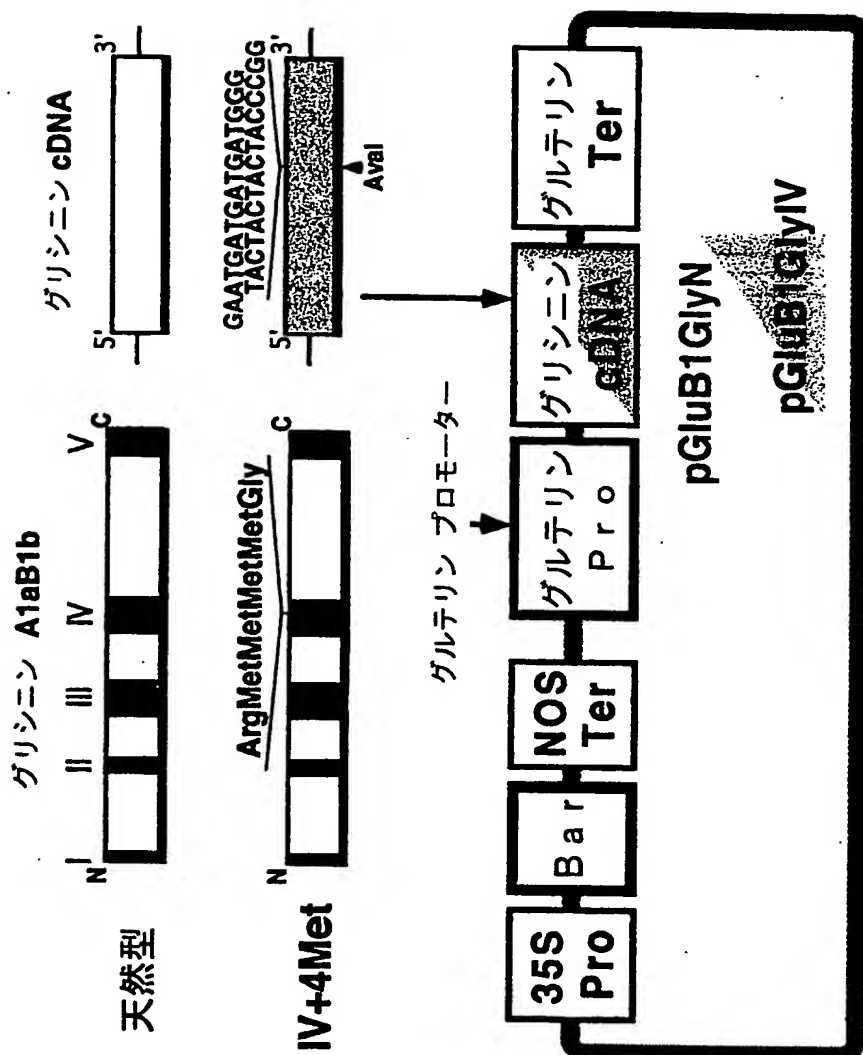


図 3

グルテリン



グリシニン

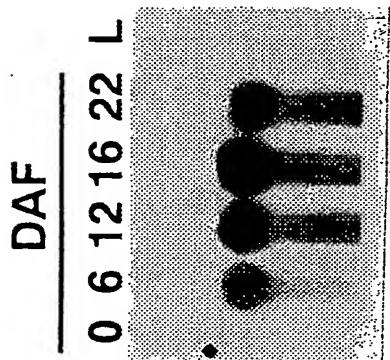
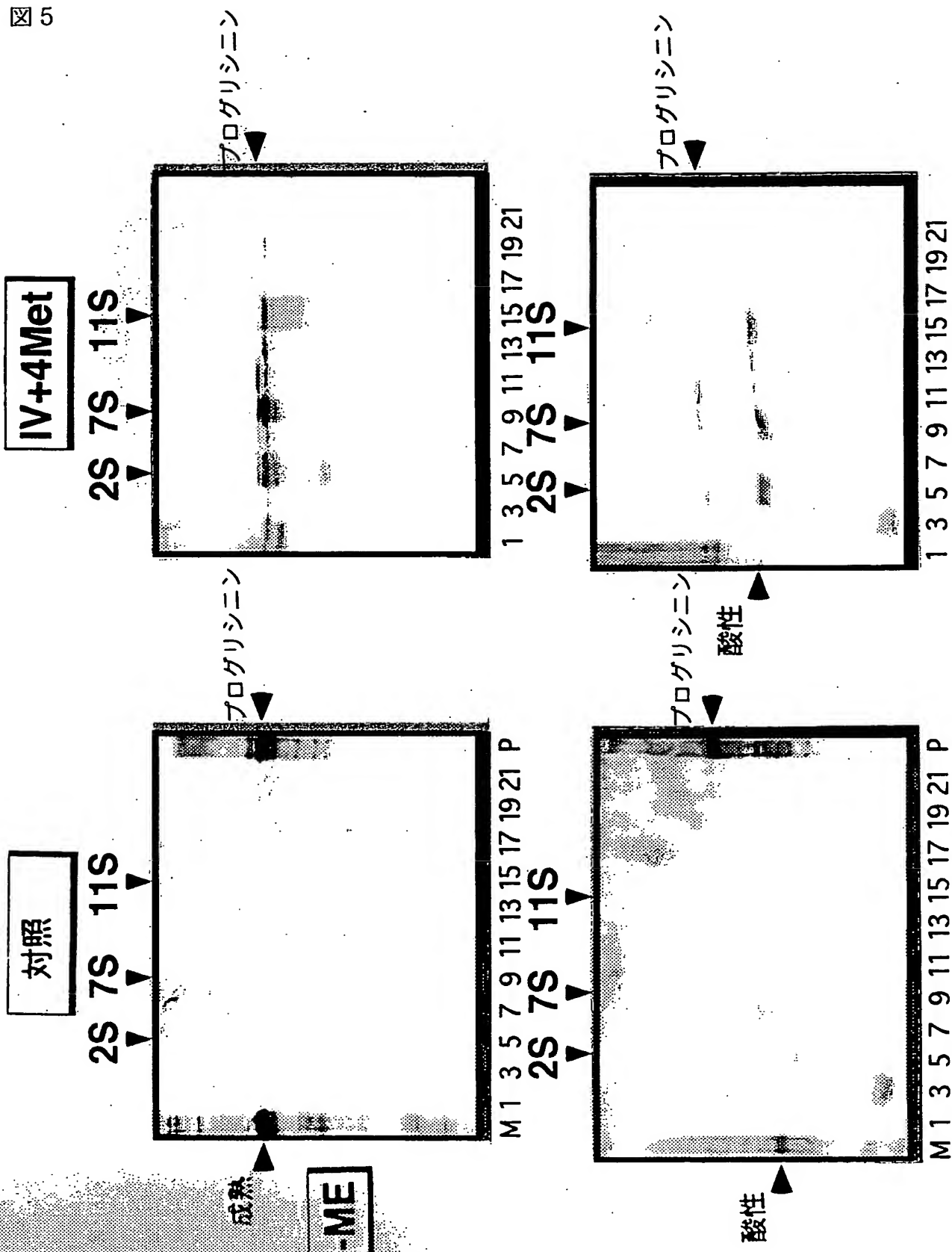
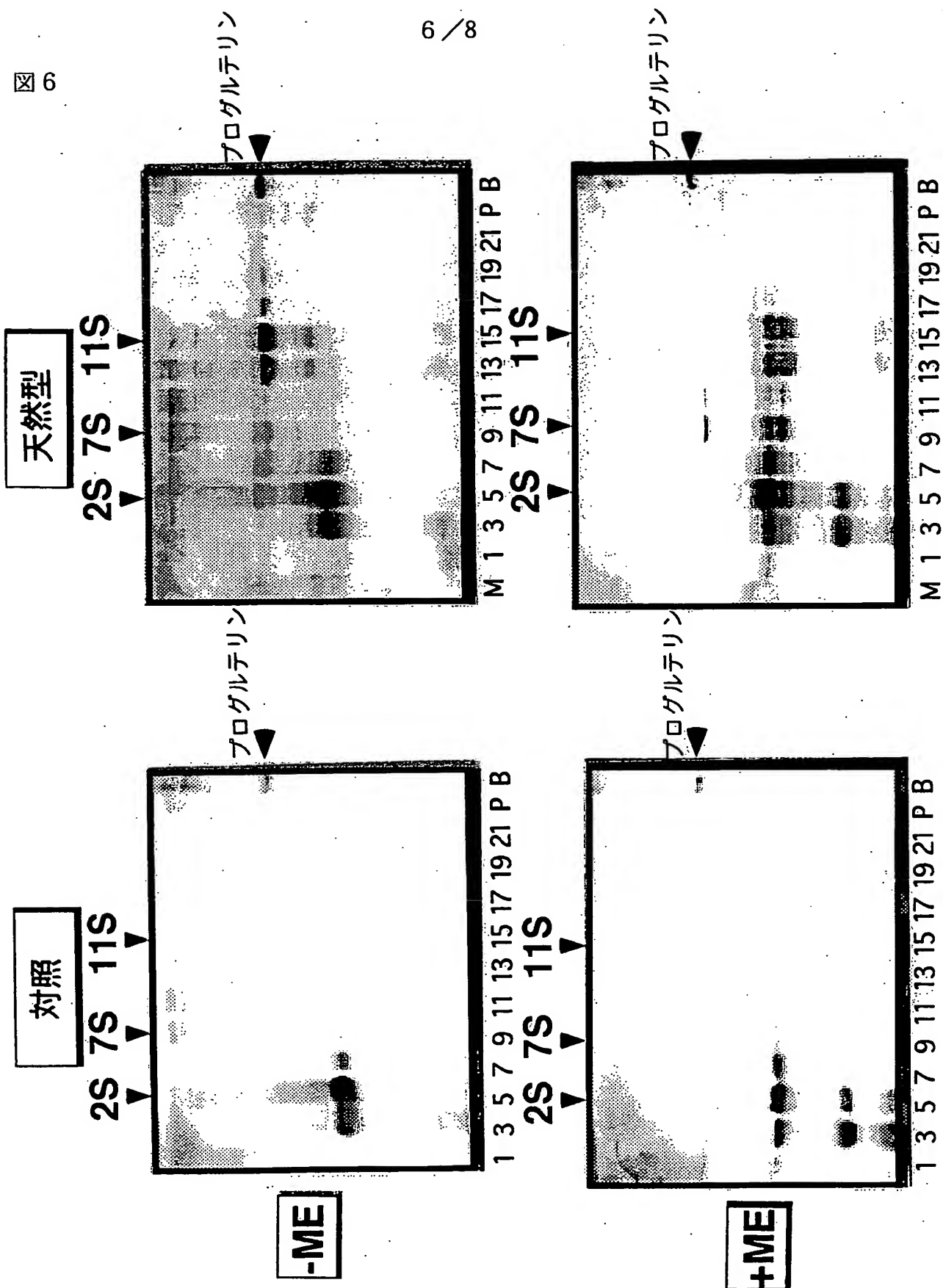


図 5



6 / 8

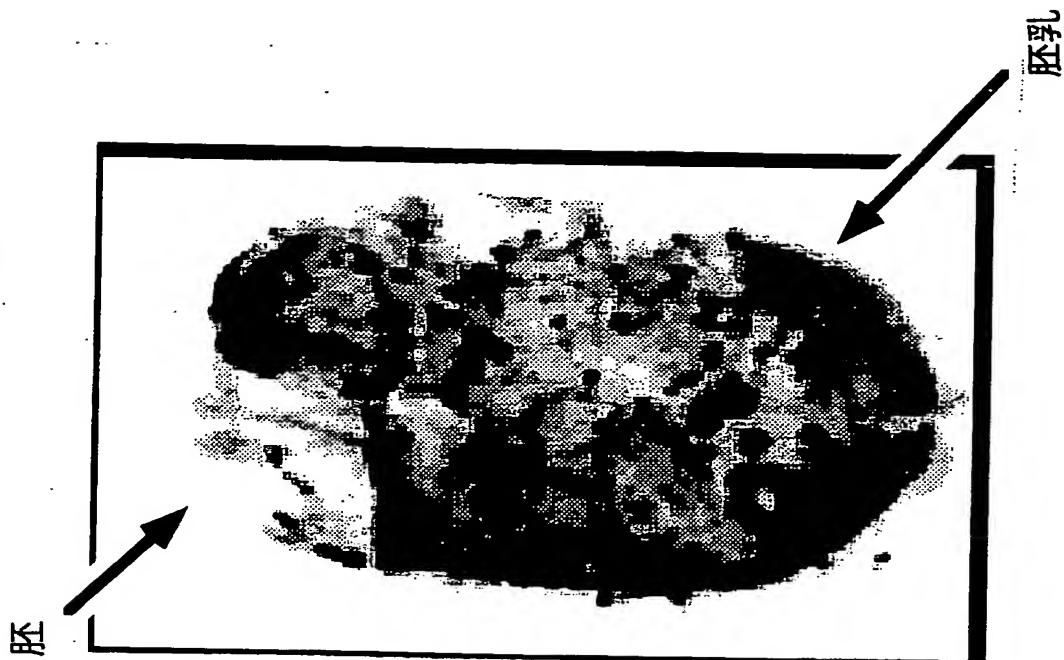
図 6



7 / 8

図 7

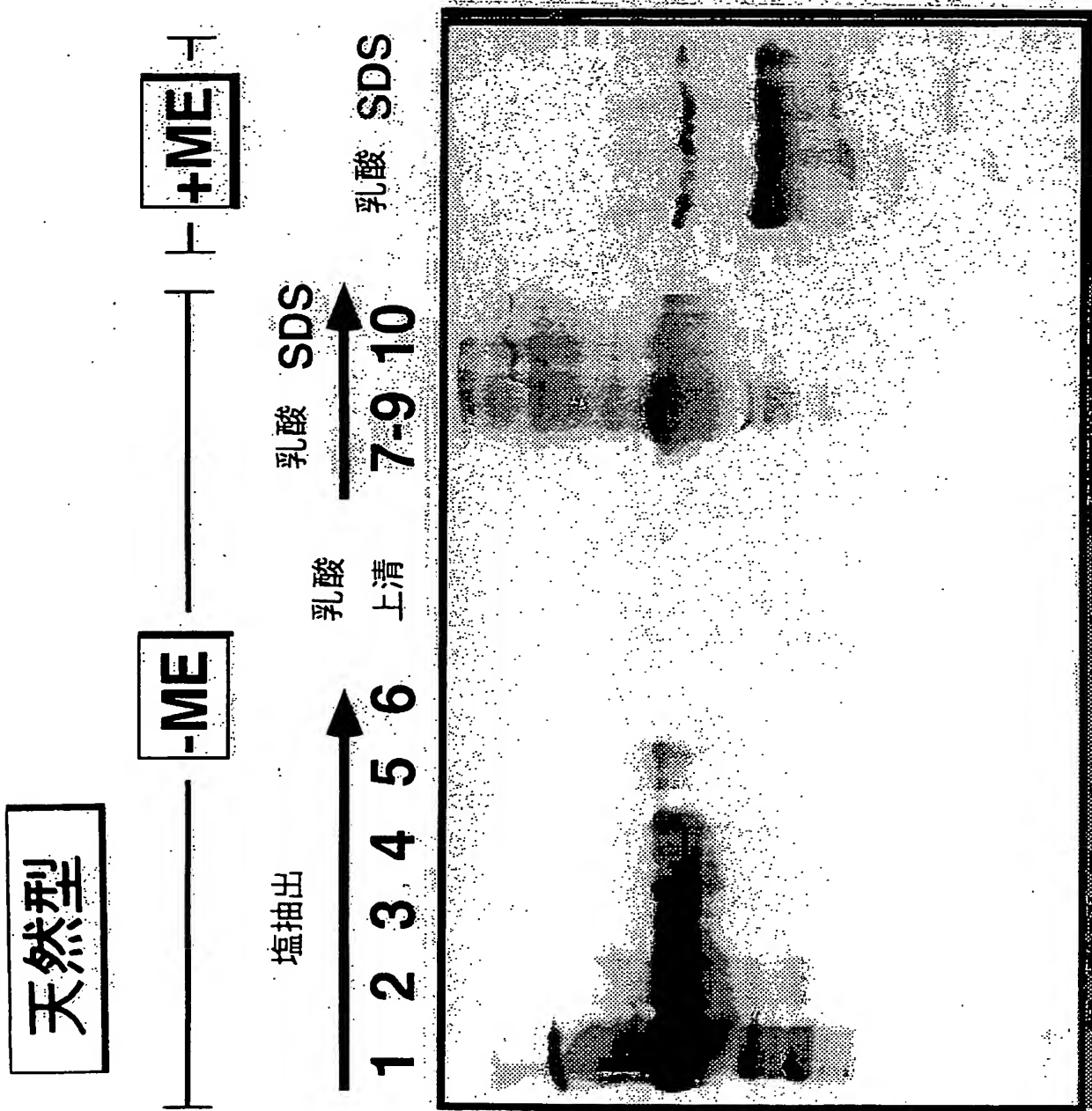
IV+4Met



対照



図 8



SEQUENCE LISTING

<110> Director general of National Institute of Agrobiological Resources

Naoki Katsura

農林水産省農業生物資源研究所長 桂 直樹

<120> Transgenic plants expressing Soybean Glycinin.

ダイズグリシニンを発現するトランスジェニック植物

<130> MOA-002PCT

<140>

<141>

<150> JP 10-223897

<151> 1998-8-7

<160> 7

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 1743

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> CDS

<222> (52)...(1536)

<400> 1

acaactcaaa cattctctcc attggtcctt aaacactcat cagtcacac c atg gcc 57

Met Ala

1

aag cta gtt ttt tcc ctt tgt ttt ctg ctt ttc agt ggc tgc tgc ttc 105

Lys Leu Val Phe Ser Leu Cys Phe Leu Leu Phe Ser Gly Cys Cys Phe

5

10

15

gct ttc agt tcc aga gag cag cct cag caa aac gag tgc cag atc caa 153

Ala Phe Ser Ser Arg Glu Gln Pro Gln Gln Asn Glu Cys Gln Ile Gln

20

25

30

aaa ctc aat gcc ctc aaa ccg gat aac cgt ata gag tca gaa gga ggg 201

Lys Leu Asn Ala Leu Lys Pro Asp Asn Arg Ile Glu Ser Glu Gly Gly

35

40

45

50

ctc att gag aca tgg aac cct aac aac aag cca ttc cag tgt gcc ggt 249

Leu Ile Glu Thr Trp Asn Pro Asn Asn Lys Pro Phe Gln Cys Ala Gly

55

60

65

gtt gcc ctc tct cgc tgc acc ctc aac cgc aac gcc ctt cgt aga cct 297

Val Ala Leu Ser Arg Cys Thr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Arg Arg Pro

70	75	80	
tcc tac acc aac ggt ccc cag gaa atc tac atc caa caa ggt aag ggt			345
Ser Tyr Thr Asn Gly Pro Gln Glu Ile Tyr Ile Gln Gln Gly Lys Gly			
85	90	95	
att ttt ggc atg ata tac ccg ggt tgt cct agc aca ttt gaa gag cct			393
Ile Phe Gly Met Ile Tyr Pro Gly Cys Pro Ser Thr Phe Glu Glu Pro			
100	105	110	
caa caa cct caa caa aga gga caa agc agc aga cca caa gac cgt cac			441
Gln Gln Pro Gln Gln Arg Gly Gln Ser Ser Arg Pro Gln Asp Arg His			
115	120	125	130
cag aag atc tat aac ttc aga gag ggt gat ttg atc gca gtg cct act			489
Gln Lys Ile Tyr Asn Phe Arg Glu Gly Asp Leu Ile Ala Val Pro Thr			
135	140	145	
ggt gtt gca tgg tgg atg tac aac aat gaa gac act cct gtt gtt gcc			537
Gly Val Ala Trp Trp Met Tyr Asn Asn Glu Asp Thr Pro Val Val Ala			
150	155	160	
gtt tct att att gac acc aac agc ttg gag aac cag ctc gac cag atg			585
Val Ser Ile Ile Asp Thr Asn Ser Leu Glu Asn Gln Leu Asp Gln Met			
165	170	175	

cct agg aga ttc tat ctt gct ggg aac caa gag caa gag ttt cta aaa 633
Pro Arg Arg Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Lys
180 185 190

tat cag caa gag caa gga ggt cat caa agc cag aaa gga aag cat cag 681
Tyr Gln Gln Glu Gln Gly Gly His Gln Ser Gln Lys Gly Lys His Gln
195 200 205 210

caa gaa gaa gaa aac gaa gga ggc agc ata ttg agt ggc ttc acc ctg 729
Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Gly Ser Ile Leu Ser Gly Phe Thr Leu
215 220 225

gaa ttc ttg gaa cat gca ttc agc gtg gac aag cag ata gcg aaa aac 777
Glu Phe Leu Glu His Ala Phe Ser Val Asp Lys Gln Ile Ala Lys Asn
230 235 240

cta caa gga gag aac gaa ggg gaa gac aag gga gcc att gtg aca gtg 825
Leu Gln Gly Glu Asn Glu Gly Glu Asp Lys Gly Ala Ile Val Thr Val
245 250 255

aaa gga ggt ctg agc gtg ata aaa cca ccc acg gac gag cag caa caa 873
Lys Gly Gly Leu Ser Val Ile Lys Pro Pro Thr Asp Glu Gln Gln Gln
260 265 270

aga ccc cag gaa gag gaa gaa gaa gaa gag gat gag aag cca cag tgc 921
Arg Pro Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Lys Pro Gln Cys

275	280	285	290	
aag ggt aaa gac aaa cac tgc caa cgc ccc cga gga agc caa agc aaa				969
Lys Gly Lys Asp Lys His Cys Gln Arg Pro Arg Gly Ser Gln Ser Lys				
	295	300	305	
agc aga aga aat ggc att gac gag acc ata tgc acc atg aga ctt cgc				1017
Ser Arg Arg Asn Gly Ile Asp Glu Thr Ile Cys Thr Met Arg Leu Arg				
	310	315	320	
cac aac att ggc cag act tca tca cct gac atc tac aac cct caa gcc				1065
His Asn Ile Gly Gln Thr Ser Ser Pro Asp Ile Tyr Asn Pro Gln Ala				
	325	330	335	
ggt agc gtc aca acc gcc acc agc ctt gac ttc cca gcc ctc tcg tgg				1113
Gly Ser Val Thr Thr Ala Thr Ser Leu Asp Phe Pro Ala Leu Ser Trp				
	340	345	350	
ctc aga ctc agt gct gag ttt gga tct ctc cgc aag aat gca atg ttc				1161
Leu Arg Leu Ser Ala Glu Phe Gly Ser Leu Arg Lys Asn Ala Met Phe				
355	360	365	370	
gtg cca cac tac aac ctg aac gcg aac agc ata ata tac gca ttg aat				1209
Val Pro His Tyr Asn Leu Asn Ala Asn Ser Ile Ile Tyr Ala Leu Asn				
	375	380	385	

gga cgg gca ttg ata caa gtg gtg aat tgc aac ggt gag aga gtg ttt 1257
 Gly Arg Ala Leu Ile Gln Val Val Asn Cys Asn Gly Glu Arg Val Phe
 390 395 400

gat gga gag ctg caa gag gga cgg gtg ctg atc gtg cca caa aac ttt 1305
 Asp Gly Glu Leu Gln Glu Gly Arg Val Leu Ile Val Pro Gln Asn Phe
 405 410 415

gtg gtg gct gca aga tca cag agt gac aac ttc gag tat gtg tca ttc 1353
 Val Val Ala Ala Arg Ser Gln Ser Asp Asn Phe Glu Tyr Val Ser Phe
 420 425 430

aag acc aat gat aca ccc atg atc ggc act ctt gca ggg gca aac tca 1401
 Lys Thr Asn Asp Thr Pro Met Ile Gly Thr Leu Ala Gly Ala Asn Ser
 435 440 445 450

ttg ttg aac gca tta cca gag gaa gtg att cag cac act ttc aac cta 1449
 Leu Leu Asn Ala Leu Pro Glu Glu Val Ile Gln His Thr Phe Asn Leu
 455 460 465

aaa agc cag cag gcc agg cag ata aag aac aac aac cct ttc aag ttc 1497
 Lys Ser Gln Gln Ala Arg Gln Ile Lys Asn Asn Asn Pro Phe Lys Phe
 470 475 480

ctg gtt cca cct cag gag tct cag aag aga gct gtg gct tagagccctt 1546
 Leu Val Pro Pro Gln Glu Ser Gln Lys Arg Ala Val Ala

485

490

495

tttgtatgtg ctacccact tttgtctttt tggcaatagt gctagcaacc aataaataat 1606

aataataata atgaataaga aaacaaaggc tttagcttgc cttttgttca ctgtaaaata 1666

ataatgtaag tactctctat aatgagtcac gaaacttttg cggaataaa aggagaaatt 1726

ccaatgagtt ttctgtc 1743

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying Glutelin gene

<400> 2

cagcagctat taggccaga gcactag 27

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying Glutelin gene

<400> 3

gggaagcttt atccgcaagc cgacctaag

29

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying Glutelin gene

<400> 4

cagctattta atcccagcac aaaccc

26

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying Glutelin gene

<400> 5

gggaagctta cattactctg aggtctcgc

29

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying Glycinin gene

<400> 6

ttcagttcca gagagcagcc

20

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying Glycinin gene

<400> 7

cgcgatcca tacaaaaagg gctctaag

28

(23) Statement concerning non-perjudicial disclosure or exception to lack of novelty.

「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する記述」

(1) 開示の日 01.04.98

開示の種類 学会発表 Presentation at the Institute's Meeting

学会の名称 日本農芸化学会 1998 年度大会
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/29, C12N5/10, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 2-156889, A (Director General of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 15 June, 1990 (15. 06. 90), Full text ; Figs. 1 to 9	1-2
Y	Full text ; Figs. 1 to 9 (Family: none)	3-10
Y	Plant Science, 130, 1997, N. Murai et al., "The pea seed storage legumin was synthesized, processed, and accumulated stably in transgenic rice endosperm", p.189-196	3-10
A		1-2
A	Plant Science, 111, 1995 S. Utsumi et al., "High level accumulation of soybean glycinin in vacuole-derived protein bodies in the endosperm tissue of transgenic tobacco seed" p.39-49	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 May, 1999 (14. 05. 99)

Date of mailing of the international search report
25 May, 1999 (25. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01057

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁸ C12N15/29, C12N5/10, A01H5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁸ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 2-156889, A (農林水産省食品総合研究所長) 15. 6月. 1990 (15. 06. 90) 全文, 第1-9図 全文, 第1-9図 (ファミリーなし)	1-2 3-10
Y	Plant Science, 130, 1997, N. Murai et al., "The pea seed storage legumin was synthesized, processed, and accumulated stably in transgenic rice endosperm", p. 189-196	3-10
A		1-2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 05. 99

国際調査報告の発送日

25.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Science, 111, 1995 S. Utsumi et al., "High level accumulation of soybean glycinin in vacuole-derived protein bodies in the endosperm tissue of transgenic tobacco seed" p. 39-49	1 - 10